



Perda de conceito em programa de inseminação artificial e de transferência de embriões em equino da raça Mangalarga Marchador⁽¹⁾

(Conceptus loss in artificial insemination and embryo transfer programs in mares of Mangalarga Marchador breed)

"Artigo Científico/Scientific Article"

AW Taveiros^A, PRM Melo^B, PP Machado^C, LM Freitas Neto^C, ER Santos Junior^C,
MHB Santos^D, PF Lima^C, MAL Oliveira^{C(*)}

^ARegimento da Polícia Montada Dias Cardoso. Av. General San Martin s/n, Bonjé, 50761 000, Recife-PE/Brasil.

^BMédica Veterinária Autônoma.

^CLaboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. 52171-900 Recife-PE/Brasil.

^DBolsita (BFP) da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Rua Benfica, 150, Madalena, 50720 001 Recife-PE/ Brasil.

Resumo

Objetivou-se monitorar, entre os anos de 2003 e 2006, a perda de conceitos em programas de inseminação artificial (IA) e de transferência de embriões (TE) equinos. As éguas ($n = 340$) da IA (G1) e da TE (G2) foram monitoradas e inseminadas, em dias alternados, até a ovulação. No 8º dia após a ovulação foram realizadas as colheitas dos embriões das doadoras e a imediata transferência para as receptoras. O diagnóstico de prenhez foi realizado no 15º dia após a ovulação no G1 e no 7º após a TE no G2, sendo todas monitoradas nos dias 20, 25, 30 e 45 para avaliação de possível perda do conceito. No G1 foram obtidas 879 gestações, sendo que 94 (10,7%) resultaram em perda do conceito, enquanto no G2, das 338 gestações, 40 (11,7%) resultaram em perda, não sendo constatada diferença ($P > 0,05$) entre G1 e G2. Quanto ao período de prenhez em que ocorreu a perda do conceito foi constatada uma queda significativa ($P < 0,05$) do 31º ao 40º dia de prenhez. Os resultados permitem concluir que a perda precoce do conceito não está relacionada com a IA ou com a TE, desde que sejam adotadas práticas de manejo semelhantes para todas as fêmeas.

Palavras-chave: equino, gestação, morte embrionária, morte fetal.

Abstract

The purpose of this study was to monitoring, between 2003 and 2006, the conceptus loss in equine programs of artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET). Mares ($n = 340$) of the AI (G1) and ET (G2) were monitored and inseminated on alternated days until ovulation. On the 8th day after ovulation were performed the embryos recovered of the donors and the immediate transfer to the recipients. The pregnancy diagnosis was performed on day 15th after ovulation in G1 and on day 7th after TE in G2, being all animals monitored on days 20, 25, 30 e 45 for evaluation of possible conceptus loss. In G1 were obtained 879 pregnancies with 94 (10.7%) conceptus loss, while in G2 40 (11.7%) from 338 pregnancies resulted in loss, being not observed difference ($P > 0.05$) between G1 and G2. Regarding to the pregnancy period of embryo loss it was observed a significant decline ($P < 0.05$) from day 31 to 40 of pregnancy. The results allow to conclude that the early conceptus loss is not related to artificial insemination or embryo transfer since there are adopted handling practices similar to all females.

Key-words: equine, pregnancy, embryonic death, fetal death.

⁽¹⁾Trabalho extraído da Tese de Doutorado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (maloufrpe@uol.com.br).

^(§)Recebido em 06/08/07 e aceito em 09/01/08.

Introdução

A inseminação artificial, além de acelerar o melhoramento genético do rebanho, possibilita uma larga expansão das características de ganhos de qualidade genética superior. Na espécie equina, essa técnica vem alcançando bons índices de fertilidade e promovendo o progresso genético num período significativamente menor do que o dispensado com a monta natural (MEIRA et al., 1993; TAVEIROS et al., 1999). Essa técnica ainda proporciona um menor desgaste dos ganhos e a não disseminação de doenças sexualmente transmissíveis (FLEURY et al., 1989; TAVEIROS, 2000).

No caso da transferência de embriões ocorre uma propagação do material genético de fêmeas zootecnicamente superiores, promovendo um aumento anual significativo do número de crias (BALL et al., 1986). No Brasil, diversos estudos têm sido realizados no sentido de difundir ambas as técnicas em equinos, sobretudo em relação à transferência de embriões (FLEURY et al., 1989/2001; TAVEIROS et al., 1999/2003).

A perda precoce do conceito na espécie equina é um problema que pode afetar a eficiência reprodutiva do rebanho porque ocorre entre 5% e 45% das gestações (BALL, 1993; DUARTE et al., 2002). Essas perdas, de acordo com Ginther (1985), são mais elevadas quando comparadas com as perdas em estádios de gestações mais avançados. Ainda segundo esses autores, são decorrentes da inadequação do meio ambiente uterino por ocasião da chegada do embrião ao útero entre o 5º e 6º dia de gestação, bem como a ausência do reconhecimento materno da prenhez em decorrência da mobilidade do embrião entre o 11º e 15º dia de gestação. Os altos índices de perdas de conceito nos programas de transferência de embriões têm comprometido a difusão e a implantação desta técnica em consequência do seu alto custo, principalmente na manutenção das receptoras (TESTA et al., 2005; ALONSO et al., 2005).

A intensificação do uso do ultra-som na Medicina Veterinária a partir da década de 80 contribuiu para aumentar a eficiência do

exame clínico-ginecológico, possibilitando detectar vesículas embrionárias entre 10 e 12 dias após a ovulação, assim como sinais precisos da evolução da gestação e da perda do conceito (PALMER e DRIANCOURT, 1980; TAVEIROS et al., 2003).

Considerando a inexistência de relato comparando perda de conceito entre fêmeas artificialmente inseminadas e fêmeas receptoras de embrião, objetivou-se monitorar o período dessa perda tanto no programa de inseminação artificial quanto no de transferência de embriões.

Material e Métodos

O experimento foi realizado entre os anos de 2003 e 2006, na Fazenda Pedra Verde localizada no Município de Limoeiro no Estado de Pernambuco. A região é caracterizada por clima quente e úmido, com temperatura média em torno de 24º C e a precipitação pluviométrica de 1248 mm³.

Foram utilizadas 340 éguas da raça Mangalarga Marchador com idade de 5 a 15 anos durante os quatro anos de experimento. As éguas foram distribuídas no grupo da inseminação artificial (G1) e no da transferência de embriões (G2).

As éguas doadoras de embrião (n = 15) foram submetidas ao manejo intensivo, sendo ofertados, no cocho, tiftum (*Cynodon spp.*), capim pangola (*Digitaria decumbens*, Stent), alfafa (*Medicago sativa*, L.) e ração comercial (Corcelina - Purina®, São Lorenzo da Mata-PE/Brasil), além de água e sal mineral (Coequisalplus - Tortuga®, São Paulo-SP/Brasil) *ad libitum*.

As éguas receptoras de embrião (n = 85) e àquelas de inseminação artificial (n = 240) foram mantidas em piquetes formados por capim pangola (*Digitaria decumbens*), sendo suplementadas com 4 Kg/dia de ração comercial (Corcelina - Purina®, São Lorenzo da Mata-PE), além de água e sal mineral (Coequisalplus - Tortuga®, São Paulo-SP/Brasil) *ad libitum*.

Todas as fêmeas foram submetidas ao exame de palpação retal com auxílio de ultra-som (Aloka SSD 500 - Tóquio/Japão) para

identificação do estro e controle da ovulação em dias alternados. A sincronização do ciclo estral entre doadoras e receptoras, com aplicação de 5 mg de PGF2 α (Lutalyse - Pfizer®, São Paulo-SP/Brasil), foi realizada

conforme proposição de Squires et al. (1985), buscando um intervalo de -1 até +3 dias da ovulação da receptora em relação à ovulação das doadoras como pode ser observado na Figura 1.

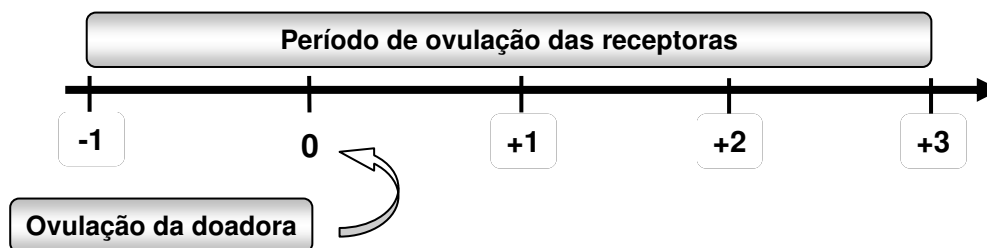


Figura 1 - Estratégia de sincronização da ovulação para transferência de embriões.

A partir da detecção do estro, as fêmeas do G1 e G2 foram inseminadas até a ovulação em dias alternados, com dose de 500×10^6 espermatozoides viáveis.

A colheita dos embriões das doadoras foi realizada no oitavo dia após ovulação, pelo método aberto, introduzindo-se a sonda (BIVONA, St. Paul-Minnesota/USA) até o corpo do útero para fixação do balão nas paredes. Utilizou-se 3 litros de solução Ringer-Lactato dividida em 3 frações (FLEURY, 1998). Após o término da última lavagem, o balão foi esvaziado e a sonda retirada. O conteúdo do filtro foi depositado em placas de petri para o rastreamento das estruturas em lupa estereoscópica, como sugerido por Oguri e Tsutsumi (1972). Imediatamente após a colheita, as doadoras receberam uma dose de PGF2 α (Lutalyse - Pfizer®, São Paulo-SP/Brasil), via intramuscular, para indução da luteólise.

O embrião foi transferido para uma placa de petri contendo meio de cultura (TQC – Nutricell, Nutrientes LTDA®, Campinas-SP/Brasil) e sob lupa estereoscópica foi avaliado quanto ao seu estágio de desenvolvimento e sua qualidade morfológica. Somente aqueles classificados entre grau I e III foram transferidos para as receptoras num período de tempo de até três horas, conforme recomendação de McKinnon et al. (1993).

A prenhez foi diagnosticada, no 15º dia após a ovulação nas fêmeas artificialmente inseminadas e no 7º dia após a transferência do embrião, por palpação retal com auxílio da ultra-sonografia, sendo todas monitoradas nos dias 20, 25, 30 e 45 da prenhez para avaliação de possível perda do conceito.

O número de gestações e perdas embrionárias detectadas foram as variáveis estudadas. Os dados foram dispostos de acordo com a biotecnologia empregada e período de gestação em que ocorreu a perda do conceito. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, considerando a probabilidade de 5%.

Resultados e Discussão

Das 240 éguas artificialmente inseminadas foram obtidas 879 gestações, sendo que 94 (10,7%) delas resultaram em perda do conceito entre o 16º e o 45º dia da gestação (Tabela 1). Resultados de perda do conceito foram também encontrados por outros autores, sendo de 12,5% entre o 14º e o 56º de gestação (WOODS et al., 1987), de 8,5% entre o 11º e 50º dia (DUARTE et al., 2002) e de 4,6% entre o 16º e o 45º dia de prenhez (WEISS et al., 2003). Perda de conceito da ordem de 13,3% entre o 10º e o 30º dia de prenhez foi descrita por Lopes et al. (1993) e de 6,8% no mesmo intervalo foi

relatada por Ferreira et al. (1999). A diversidade de resultados entre os autores é, provavelmente, devido à adoção de práticas diferenciadas de manejo, nutrição, estresse à condição edáfo-climática, além da heterogeneidade de composição do rebanho.

Quanto ao período de prenhez em que ocorreu a perda do conceito foi constatada uma queda significativa ($P < 0,05$) do 31º ao 40º dia de gestação em relação ao período compreendido entre o 16º e o 30º dia. Este dado corrobora, em parte, os de Ferreira et al. (1999) e os de Duarte et al. (2002), os quais observaram uma maior porcentagem de perda até o 20º dia. Autores como Bouie e Bouie (1976) e Blue (1981) acreditam que a perda precoce do conceito pode ser devido à senilidade dos gametas que formam o conceito com anomalias cromossômicas e morfológicas, resultado que também pode ser explicado, considerando-se uma provável adversidade do ambiente uterino ou mesmo da tuba uterina (GINTHER, 1985; BALL e WOODS, 1987).

Tabela 1 - Taxas de prenhez e perda do conceito após a inseminação artificial em éguas da Raça Mangalarga Marchador.

Período de gestação (dias)	Inseminação artificial		
	Prenhez n	Perda do conceito	
		n	%
16 a 20	879	37 ^a	4,2
21 a 30	879	39 ^a	4,4
31 a 45	879	18 ^b	2,0
Total	879	94	10,6

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa para o teste de X^2 ($P < 0,05$).

Das 338 gestações resultantes da transferência de embrião, 40 (11,7%) delas resultaram em perda (Tabela 2), resultado inferior aos 23,0% de Wilson e Rowley (1987), 17,0% de Wade et al. (1989) e aos 15,5% de Carnevale et al. (2000). Acredita-se que esta baixa porcentagem de perda de conceito no G2 deveu-se a utilização

exclusiva de estruturas classificadas entre grau I e III, conforme orientação de McKinnon et al. (1993).

Quanto ao momento em que ocorre a perda do conceito, observou-se existir aumento ($P < 0,05$) somente após o 20º dia de gestação, achado que corrobora o verificado por Carnevale et al. (2000), que em seu estudo registrou maior perda entre o 17º e o 25º dia de prenhez. Neste trabalho, as perdas no G2 foram mais tardias, provavelmente, devido ao retardo na implantação do embrião, justificativa baseada no relato de Taveiros et al. (2003), os quais registraram desenvolvimento mais lento da vesícula germinativa, possivelmente, associado ao crescimento do embrião até o 30º dia de prenhez resultantes de transferência. O resultado aqui obtido pode ser explicado pelos mesmos motivos expostos quando da perda do conceito do G1.

Tabela 2 - Taxas de prenhez e perda do conceito após a transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador.

Período de gestação (dias)	Transferência de embrião		
	Prenhez n	Perda do conceito	
		n	%
16 a 20	338	8 ^a	2,4
21 a 30	338	21 ^b	6,2
31 a 45	338	11 ^{ab}	3,3
Total	338	40	11,9

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa para o teste de X^2 ($P < 0,05$).

Na literatura consultada, não foi encontrada qualquer referência comparando perda de conceito da prenhez proveniente da inseminação artificial com a de transferência de embriões. Neste trabalho não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre as perdas de conceitos ocorridas no G1 e G2, indicando que após ocorrer à implantação e o desenvolvimento embrionário, as causas da perda independe da técnica reprodutiva utilizada.

Tabela 3 - Taxas de prenhez e perda de conceito em éguas submetidas a inseminação artificial (G1) e a transferência de embriões (G2).

Grupo	Prenhez n	Perda do conceito	
		n	%
G1	879	94	10,7
G2	338	40	11,8
Total	1217	134	22,5

Diferença não significativa para teste do X^2 ($P > 0,05$).

Conclusão

Os resultados permitem concluir que a perda precoce do conceito não está relacionada com a inseminação artificial ou com a transferência de embriões, desde que sejam adotadas práticas de manejo semelhantes para todas as fêmeas.

Referências

ALONSO, M.A. et al. Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.204, 2005.

BALL, B.A. Embryonic death in mares. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.517-531.

BALL, B.A. et al. Pregnancy rate 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. **Theriogenology**, v.26, p.611-619, 1986.

BALL, B.A.; WOODS, G.L. Embryonic loss and early pregnancy loss in the mare. **Compendium on Continuing Education**, v.9, p.459-470, 1987.

BOUIE, J.G.; BOUIE, A. Chromosome anomalies in early spontaneous abortion: their consequences on early embryogenesis. **Current topics in pathology**, v.62, p.193-208, 1976.

BLUE, M.G. A cytogenetical study of prenatal loss in the mare. **Theriogenology**, v.15, p.295-309, 1981.

CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 5th. 2000. Saari. **Proceedings...** Saari:

Havemeyer Foundation, 2000. n.3, p.91-92.

DUARTE, M.B. et al. Incidência e perda de prenhez até 50^o dia em éguas Quarto de Milha. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.643-647, 2002.

FERREIRA, J.B.P. et al. Incidência e caracterização ultra-sonográfica da morte embrionária em éguas da raça Campolina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.202-203, 1999.

FLEURY, J.J. Transferência não cirúrgica de embriões eqüinos colhidos no oitavo dia pós-ovulação. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.1, 1998.

FLEURY, J.J. et al. Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 2., 1989. Banft-Alberta. **Proceedings...** Banft-Alberta: Havemeyer Foundation, 1989. p.73-74.

FLEURY, J.J. et al. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.29-33, 2001.

GINTHER, O.P. In: _____. **Ultrasound imaging and reproductive events in the mare**. Madison: Equiservice, 1985. 377p.

LOPES, M.D. et al. Morte embrionária precoce em éguas: Aspectos clínicos e hormonais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10. 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CRBA, 1993. v.2, p.231-380.

MEIRA, C. et al. Cryopreservation of equine embryos using glicerol and 1,2 propanediol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.64, 1993.

McKINNON, A.O. et al. **Equine Reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. 1137p.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.31, p.187-195, 1972.

PALMER, E.; DRIANCOURT, A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology.

Theriogenology, v.13, p.203-216, 1980.

SQUIRES, E.L. et al. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Laboratory**, v.1, p.38, 1985.

TAVEIROS, A.W. et al. Diferentes receptoras na transferência de embriões eqüinos Mangalarga Marchador. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.391-393, 1999.

TAVEIROS, A.W. **Transferência de embriões eqüinos da raça Mangalarga Marchador**. 2000. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

TAVEIROS, A.W. et al. Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of different reproductive status during the first 30 days after embryo transfers. **Veterinary Record**, v.153, p.558-560, 2003.

TESTA, A.C. et al. Perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião em anestro tratadas com progesterona de longa duração. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl. 1, p.198, 2005.

WADE, J. et al. Equine embryo transfer in Ireland from research into commercial practice. **Equine Veterinary Journal**, v.8, p.76, 1989.

WEISS, R.R. et al. Inseminação artificial em éguas com sêmen *in natura* e diluído. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.19-22, 2003.

WILSON, J.M.; ROWLEY, W.K. Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum lactating mares. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.295, 1987.

WOODS, G.L. et al. Early pregnancy loss in the brodmare. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 35, p.455-459, 1987.